Library

DIE KONZENTRATION DES LYTISCHEN PRINZIPS UND IHRE BEZIEHUNGEN ZUM ABLAUF DER BAKTERIOPHAGENREAKTION

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER

UNIVERSITÄT BASEL

VORGELEGT

VON

HANS MEULI

VON NUFENEN

VERLAGSBUCHHANDLUNG JULIUS SPRINGER IN BERLIN. 1923

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag
von Herrn Professor R. Doerr

Die vorliegende Arbeit erscheint unter gleichem Titel als
Studien über Bakteriophagen, II. Mitteilung, in der Zeitschrift für Hygiene und
Infektionskrankheiten, Band 99

Herrn Professor *Doerr* sage ich für freundlichen Rat und Hilfe herzlichen Dank

Entkleidet man die verschiedenen Beschreibungen und Begriffsbestimmungen des Phänomens der Bakteriophagie oder der übertragbaren Lyse aller Einzelheiten, welche nicht unbedingt zum Wesen des Vorganges gehören, so bleibt schließlich als Kern des gesamten experimentellen Tatsachenmaterials die Aussage zurück, daß jeder Bakteriophagenprozeß eine gegenseitige Beeinflussung *lebender Bakterienzellen* und *eines von lebenden Bakterien abtrennbaren Stoffes* repräsentiert; bei den Bakterien kommt die stattgehabte Bewirkung durch eine Störung ihrer normalen Funktionen, die sich bis zum Tode und zur Auflösung der Zellen steigern kann, zum Ausdruck, bei dem auslösenden Stoff durch eine gewaltige Zunahme seiner Konzentration. Die *Natur der Reaktion* ist vorderhand völlig unbekannt, so daß sich die Hypothesenbildung in extremen, nur durch die Anlehnung an naheliegende Analogien aus den Gebieten der Infektion, Immunität und Fermentforschung einigermaßen eingeengten Grenzen bewegen kann. Das Studium der Literatur lehrt übrigens, daß man sich bisher weniger mit der Natur der Bakteriophagenreaktion als mit den *Eigenschaften einer Reaktionskomponente, des bakteriophagen oder lytischen Prinzips*, befaßt hat; schon *Twort* und *d'Hérelle* haben Experiment und Spekulation ganz im letzteren Sinn orientiert, und die folgenden Autoren sind von der einmal eingeschlagenen Richtung nur selten und meist nicht entschieden genug abgewichen. Man findet daher in einer großen Zahl von Publikationen breit angelegte Erörterungen, ob das lytische Prinzip ein Ultramikrobe oder ein unbelebtes Agens ist, welche Teilchengröße ihm zukommt, falls es in wässerigen Flüssigkeiten dispergiert erscheint, welche Resistenz es gegen die verschiedenen äußeren Einflüsse besitzt, in welchem Grade es sich zu vermehren vermag und wie sich diese Zunahme messen läßt usw.; die

Vorgänge an den empfindlichen Bakterien treten dagegen stark in den Hintergrund, indem man sich meist begnügt, die *Bakteriolyse* ohne weitere Begründung als die essentielle Veränderung zu betrachten und sie mit den Auflösungen infizierter oder durch Fermente geschädigter Zellen auf eine Stufe zu stellen. Es ist zweifellos möglich, auch auf diesem Wege zu einer weitgehenden Aufschließung des Bakteriophagenproblems zu gelangen; aber man wird zugeben, daß die Methode einseitig und daher auch nicht frei von Fehlerquellen ist.

Von solchen Überlegungen geleitet haben *Doerr* und *Grüninger* (vgl. die erste in der Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. veröffentlichte Mitteilung) versucht, *die Bakteriophagenreaktion als Funktion der Zeit darzustellen.* Da die Reaktion an sich einer derartigen Untersuchung unzugänglich war, wurden die Veränderungen an den beiden wesentlichen Reaktionskomponenten, den *lebenden Bakterien* und dem *bakteriophagen Agens*, analysiert, und zwar zunächst in rein quantitativer Hinsicht, durch Feststellung der *Zahl der lebenden Keime* einerseits und durch *Bestimmung der Lysinkonzentration* andererseits. Die sonstigen Reaktionsbedingungen (H-Ionenkonzentration, Zusammensetzung des Nährbodens, Temperatur) waren vorerst so gewählt, daß sie ein Optimum des Reaktionsablaufes ermöglichten; später wurden sie variiert und die durch die jeweilige Variation bedingte Beeinflussung des Reaktionsgeschehens konstatiert.

Auf die Ergebnisse braucht hier nicht in extenso eingegangen zu werden. Nur des leichteren Verständnisses halber sei ein bei optimalen Reaktionsbedingungen ($p_H = 7{,}65$, Temperatur $= 37°$) angestellter Versuch rekapituliert.

Versuch.

In einen im Wasserbad von 37° stehenden Kolben mit 200 ccm Bouillon wurden zur Zeit $t = 0$ Colibakterien (14 000 lebende Keime pro Kubikzentimeter Bouillon) und ein zugehöriges übertragbares Lysin eingetragen; die Konzentration des letzteren im Kolben war so eingestellt, daß $0{,}1 = 10^{-1}$ ccm des Kolbeninhaltes in 9 ccm Bouillon noch gerade Auflösung (Bakteriophagie) hervorrief, wenn eine Öse 16stündiger Colibouillonkultur eingesät wurde. Die Lysinkonzentration entsprach somit nach der von *Werthemann* vorgeschlagenen Bezeichnung dem Lysinexponenten 1. Nun wurden nach verschiedenen Zeitintervallen Proben aus dem Kolben entnommen und für jede Probe bestimmt:

a) die Zahl der lebenden Colibakterien (im Gelatineplattenverfahren),
b) die Konzentration des lytischen Prinzips mit Hilfe der von *Appelmans* eingeführten, von *Werthemann* modifizierten Dilutionsmethode.

Die nachstehende Abb. 1 (der Mitteilung von *Doerr* und *Grüninger* entlehnt) gibt die Resultate in graphischer Darstellung wieder; die ausgezogene Linie verbindet die ermittelten Werte für die Lysinexponenten, welche zu den Logarithmen der Lysinkonzentrationen in engster Relation stehen, die gestrichelte die jeweils im Kubikzentimeter Bouillon vorhandenen Zahlen lebender Colikeime.

Betreffs der Diskussion der beiden Kurven sei auf die Arbeit von *Doerr* und *Grüninger* verwiesen.

An dieser Stelle soll nur ein Moment genauer ins Auge gefaßt werden, nämlich der Umstand, *daß die Lysinkonzentration nach anfänglich rapider Zunahme* (Verzehnfachung in je 15 Minuten) *plötzlich stationär wird und in der Folge auf einem und demselben Niveau verharrt.* Die Erklärung dieser Erscheinung wäre relativ einfach, wenn sie nur für den beschriebenen Fall d. h. für den Komplex der hier gewählten Versuchsbedingungen zu gelten hätte. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Arretierung des Lysinanstieges mit dem Aufhören der Bakterienvermehrung bzw. mit dem Überwiegen des Bakterienunterganges über die Vermehrung fast zusammenfällt, und die kausale Verknüpfung dieser gleichzeitigen Vorgänge liegt nicht nur nahe, sondern muß sogar bei der zwangläufigen Abhängigkeit von Bakterienleben und Lysinzunahme als gut begründet angesehen werden. Die Sachlage kompliziert sich aber erheblich durch die weitere Beobachtung, *daß die Lysinproduktion* **immer bei demselben Werte** *halt macht, auch dann, wenn man von den Versuchsbedingungen, welchen Abb. 1 entspricht, beträchtlich abweicht.* Die Durchsicht der Versuchsprotokolle von *Doerr* und *Grüninger* oder ein Blick auf die Abbildungen in ihrer Arbeit zeigt bereits, daß die maximale bzw. terminale Lysinkonzentration dem Lysinexponenten 8 entsprach, gleichgültig, ob die Bakterienvermehrung relativ gering oder sehr beträchtlich war und ob das Lysin gleichzeitig mit den Bakterien oder erst 3 bis 5 Stunden später zur Versuchsbouillon zugesetzt wurde. Dazu kamen noch sehr viele, zu den verschiedensten Zwecken ausgeführte Einzeltitrationen bakteriophagenhaltiger Bouillons, bei denen immer wieder der Lysinexponent 8 erhalten wurde, vorausgesetzt natürlich, daß man die Bakteriophagenreaktion vollständig ablaufen ließ und nicht durch vorzeitiges Titrieren statt des Endtiters einen Zwischentiter bestimmte. Terminale Lysinexponenten, welche vom Werte 8 verschieden waren, gehörten zu den Seltenheiten. Die beobachteten Abweichungen schwankten (für den untersuchten Colistamm und den zugehörigen Bakteriophagen) zwischen 7 und 9, waren also im Verhältnis zur Gesamtkonzentration und bei Berücksichtigung der Ungenauigkeiten des Titrationsverfahrens nicht sehr groß.

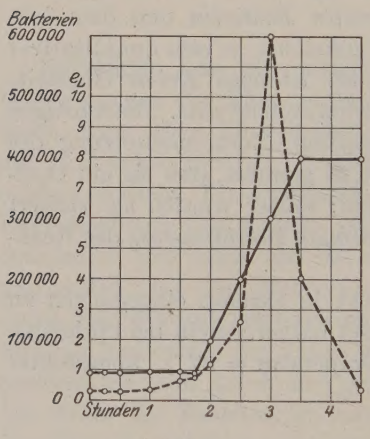

Abb. 1.

Man erhielt sonach den Eindruck, *daß der Zunahme des lytischen Prinzips eine ganz bestimmte obere Grenze gezogen erscheint*, welcher der Reaktionsablauf — von den Reaktionsbedingungen bis zu einem gewissen Grade unabhängig — zustrebt.

Einer Anregung von *Doerr* folgend, habe ich diese Verhältnisse genauer zu analysieren und die ersten aus ihnen ableitbaren Konsequenzen festzustellen gesucht, wobei sich mehrere interessante Tatsachen ergaben, interessant nicht nur an sich, sondern auch im Hinblick auf das Gesamtproblem der Bakteriophagie.

Wenn man eine bakteriophagenhaltige Bouillon nach dem Dilutionsverfahren von *Appelmans* und *Werthemann* austitrieren will, geht man bekanntlich so vor, daß man eine Reihe von Eprouvetten mit je 9 ccm steriler Bouillon hernimmt, in die erste 1 ccm der zu titrierenden Ausgangsbouillon, in die zweite 1 ccm aus der ersten usf. einträgt, dann die ganze Reihe mit je einer Öse einer 16stündigen Bouillonkultur des für das Lysin empfindlichen Bacteriums beimpft und die beschickten Röhrchen bei 37° hält, bis die Reihe eine scharfe, sich nach rechts nicht mehr verschiebende Grenze zeigt; die Röhrchen links von der Grenze weisen einen *klaren*, jene rechts von der Grenze einen *trüben* Inhalt auf, indem in den ersteren eine Bakteriophagenreaktion abgelaufen ist, während in den letzteren ungestörte Bakterienvermehrung erfolgte. Das letzte, noch klare Röhrchen der Reihe gibt durch die Menge der zu titrierenden lysinhaltigen Ausgangsbouillon, welche in ihm rechnungsgemäß enthalten ist, das Maß für die Konzentration des Lysins in dieser Ausgangsbouillon an.

In sämtlichen klar gebliebenen oder klar gewordenen Eprouvetten einer derartigen Auswertungsreihe spielt sich also eine Bakteriophagenreaktion ab, und zwar stets unter denselben Bedingungen; *nur* ein *Faktor verändert sich von Röhrchen zu Röhrchen, indem die initiale Lysinkonzentration jeweils um das Zehnfache abnimmt* oder — was das nämliche besagt — indem der Lysinexponent (zur Zeit $t = 0$) von links nach rechts jeweils um 1 sinkt. Ergänzen wir die Reihe noch nach links um ein Röhrchen, welches 9 ccm konzentriertes Lysin (unverdünnte Ausgangsbouillon) enthält, so wird sie ein nach beiden Seiten abgegrenztes Intervall repräsentieren, welches von der höchsten bis zur geringsten (noch wirksamen) Lysinkonzentration reicht und innerhalb dessen jedes Glied zu Beginn des Versuchs in drei (dasselbe besagenden) Schreibweisen charakterisiert werden kann. Jedes Röhrchen läßt sich nämlich bezeichnen a) durch die *absolute Menge konzentrierter Ausgangsbouillon*, welche in ihm enthalten ist; b) durch den *Lysinexponenten*, den man bei der Titration nach der Methode von *Appelmans* und *Werthemann* finden würde bzw. tatsächlich feststellt und 3. durch die Angabe des rechnungsmäßigen Verdünnungs-

grades. Für eine Ausgangsbouillon vom Lysinexponenten 8 würde eine solche komplette Reihe 10 Röhrchen umfassen und gäbe — in den drei eben erwähnten Formen angeschrieben — folgendes Bild:

Tabelle I.

Nr. des Röhrchens	Menge der konz. Ausgangsbouillon in ccm	Lysinexponent des Röhrchens	Konzentration der Ausgangsbouillon
1.	$0{,}9 \cdot 10^{+1}$	— 8	1 : 1
2.	$0{,}9 \cdot 10^{0}$	— 7	1 : 10
3.	$0{,}9 \cdot 10^{-1}$	— 6	1 : 100
4.	$0{,}9 \cdot 10^{-2}$	— 5	1 : 1000
5.	$0{,}9 \cdot 10^{-3}$	— 4	1 : 10 000
6.	$0{,}9 \cdot 10^{-4}$	— 3	1 : 100 000
7.	$0{,}9 \cdot 10^{-5}$	— 2	1 : 1 000 000
8.	$0{,}9 \cdot 10^{-6}$	— 1	1 : 10 000 000
9.	$0{,}9 \cdot 10^{-7}$	0	1 : 100 000 000
10.	$0{,}9 \cdot 10^{-8}$	+ 1	1 : 1 000 000 000

Ein elftes Röhrchen würde nicht mehr dem betrachteten Intervall angehören d. h. 0,9. 10^{-9} ccm der untersuchten Bouillon (entsprechend einer Verdünnung von 1 : 10 Milliarden) würden nicht mehr genügen, um den Ablauf einer Bakteriophagenreaktion zu ermöglichen; die Frage nach der Größe des Lysinexponenten hätte für ein elftes Glied dieser Reihe überhaupt keinen Sinn.

Die obige Tabelle illustriert den Zustand der einzelnen Eprouvetten hinsichtlich ihres Lysingehaltes **zur Zeit t = 0**, also am Beginn der Bakteriophagenreaktion. *Wie gestalten sich aber die Verhältnisse nach Ablauf dieser Reaktion? Ist die Konzentration des bakteriophagen Prinzips (des Lysins) nunmehr in jedem Röhrchen verschieden, wie man aus Wahrscheinlichkeitsgründen anzunehmen geneigt wäre?*

Um darüber ins klare zu kommen, braucht man nur für jedes der 10 Röhrchen nach Ablauf der Bakteriophagenreaktion den Lysintiter zu bestimmen, indem man von jedem eine neue Verdünnungsreihe ausgehen läßt und im übrigen genau so verfährt, wie das die Angaben von *Appelmans*, *Werthemann*, *Doerr* und *Grüninger* vorschreiben. Will man dem Einwand begegnen, daß der Inhalt der Röhrchen trotz abgelaufener Lyse nicht steril sein muß, sondern daß die Bouillons noch lebensfähige, vielleicht sogar *resistente* oder *lysinogene Colikeime* enthalten können, welche das Ergebnis der Titrationen zu stören vermöchten, so kann man diese Fehlerquelle ausschalten, indem man alle Eprouvetten durch 1stündiges Erwärmen auf 57° von lebenden Colibacillen befreit; indes ergaben vergleichende Versuche, daß die Unterlassung dieser Vorsichtsmaßregel das Ergebnis nicht alteriert.

Dieses Ergebnis entsprach nun in keiner Weise der Erwartung. *Meist war der Lysinexponent nach Ablauf der Reaktion in sämtlichen*

10 Röhrchen ganz gleich und belief sich für das erste wie für das zehnte Röhrchen auf 8, oder es machte (in selteneren Fällen) das letzte positive Röhrchen insofern eine Ausnahme, als der Lysinexponent den Wert 9 zeigte, eine Abweichung von der Regel, die wohl zunächst nicht ins Gewicht fällt.

Führt man somit ein Experiment der eben geschilderten Art vollständig durch, so bekommt man 10 *sekundäre Auswertungsreihen*, welche in ihrer Konfiguration vollständig der primären, in der Tabelle veranschaulichten Reihe ähneln; ebenso kann man von den sekundären Reihen *tertiäre* abzweigen, und auch diese haben wieder das gleiche Gepräge d. h. in jedem Röhrchen der sekundären Auswertungsreihen verläuft die Bakteriophagenreaktion so, daß ein und derselbe Endtiter (Lysinexponent 8) erreicht und nicht überschritten wird.

Diese Versuche wurden so oft wiederholt, daß über die Gesetzmäßigkeit der Resultate kein Zweifel obwalten kann. Die angewendete Temperatur betrug stets 37° (Thermostat!); ob auch bei *Zimmertemperatur* oder noch niedrigeren Wärmegraden ein konstanter Endtiter erzielt wird und ob derselbe mit dem bei 37° beobachteten identisch ist, konnte vorläufig noch nicht geprüft werden. Auch sei ausdrücklich hervorgehoben, daß nur mit **einer** *Colirasse* („Coli sensibel") und **einem** *Bakteriophagenstamm* (Colibakteriophage von *Bordet*) gearbeitet wurde[1]), so daß der Geltungsbereich des Gesetzes für andere Bakterien-Bakteriophagenkombinationen erst abgesteckt werden muß. Wohl aber haben wir uns überzeugt, daß die Menge der Bakterienaussaat innerhalb gewisser, ziemlich weiter Grenzen irrelevant ist.

Versuch.

Von einer Bakteriophagenbouillon wurden drei identische Verdünnungsreihen im Verhältnis von 1 : 9 angelegt. Die erste diente zur Feststellung des Titers nach *Appelmans* und *Werthemann* und wurde in der gewöhnlichen Weise mit *einer Öse* einer 16stündigen Colibouillonkultur beimpft. In jedes Röhrchen der zweiten Reihe kam etwa *ein Hundertstel* dieser Bakterienmenge, in jede Eprouvette der dritten das *Hundertfache* (also 100 Ösen). *Die Bakterieneinsaaten verhielten sich somit wie* **100 : 1 : 10 000.**

In allen drei Reihen war das 10. Röhrchen nach völligem Ablauf der Reaktion klar, das 11. durch Bakterienwachstum stark getrübt. Der Lysinexponent belief sich also in allen drei Fällen auf 8.

[1]) Später konnten aber doch noch zahlreiche Experimente mit einem *Shigastamme* („Dysenterie Lauda") und einem zugehörigen lytischen Prinzip, das uns Prof. *Bail* in liebenswürdigster Weise überlassen hatte, ausgeführt und zum Teil im Texte der vorliegenden Mitteilung berücksichtigt werden. Es ergab sich, daß sowohl die Angaben von *Doerr* und *Grüninger* als auch die hier beschriebenen Beobachtungen auch für die Bakteriophagenreaktionen der Shigabakterien richtig sind, was bei den großen biologischen Differenzen, die zwischen diesen unbeweglichen Toxinbildnern und den typischen Colirassen bestehen, für die allgemeine Gültigkeit der erzielten Resultate und der daraus deduzierten Schlüsse spricht.

Es wurde nun das 2. und das 10. Röhrchen der zweiten und dritten Reihe in der gewöhnlichen Art austitriert und auch hierbei immer wieder derselbe Lysintiter ($e_L = 8$) ermittelt.

Sieht man von den provisorischen, durch die Variationsbreite der Versuchsbedingungen gegebenen und zum Teil bereits erwähnten Einschränkungen ab, so würde das aus diesen Beobachtungen ableitbare Gesetz in folgender Art formulierbar sein:

Die terminale Konzentration, welche das lytische Prinzip im Verlaufe einer Bakteriophagenreaktion erreicht, ist eine konstante, von der Ausgangskonzentration unabhängige Größe. Sie ändert ihren Wert nicht, wenn man die zu Beginn der Reaktion vorhandene Menge lebender und für das Lysin empfindlicher Bakterien in weiten Grenzen variiert (etwa zwischen 100 und 1 000 000 lebender Keime im Kubikzentimeter des Reaktionsvolums).

Lassen wir den zweiten Satz zunächst beiseite und überlegen wir die *Tragweite des so eigentümlichen Verhältnisses der initialen zur terminalen Lysinkonzentration.* Es leuchtet wohl sofort ein, daß die Unabhängigkeit der terminalen von der initialen Lysinkonzentration nur unter der Voraussetzung denkbar ist, *daß sich das Reaktionsgeschehen oder der Reaktionsablauf je nach der initialen Lysinkonzentration ändert.* In jeder Eprouvette einer Auswertungsreihe, wie sie beispielsweise in Tab. I wiedergegeben ist, spielt sich nach der Beimpfung mit empfindlichen Bakterien ein **anderer** Prozeß ab: sonst könnte ja die Lysinkonzentration im ersten Röhrchen nicht die gleiche bleiben, während sie im zehnten Röhrchen um das Milliardenfache anwächst. *Worin bestehen aber die Differenzen?*

Es war zu vermuten, daß die postulierten Unterschiede des Reaktionsablaufes wenigstens zum Teil manifest werden würden, wenn man die von *Doerr* und *Grüninger* benutzte Versuchsanordnung auch hier zur Anwendung bringen und in regelmäßigen Zeitintervallen die Zahl der lebenden Keime in der Volumeinheit des Reaktionsmilieus sowie die jeweilige Bakteriophagenkonzentration bestimmen würde.

Für den vorliegenden Zweck war es natürlich notwendig, alle Versuchsbedingungen möglichst gleich zu halten und der Fragestellung entsprechend lediglich die initiale Lysinkonzentration innerhalb der äußersten Grenzen (zwischen den Lysinexponenten -8 resp. -9 und $+1$) zu variieren. Die Analysen des Reaktionsablaufes, welche *Doerr* und *Grüninger* durchgeführt haben, betreffen durchwegs Fälle, *in welchen der initiale Lysintiter ein sehr niedriger war.* Der Lysinexponent betrug im Beginne ihrer Versuche 0, -1 oder -2, Werte, welche den Röhrchen 7—9 der Tab. I korrespondieren; die konzentrierten Lysinbouillons, welche, wie erwähnt, meist den Lysinexponenten 8 besitzen, waren also im Verhältnis von $1 : 10^{-6}$—10^{-8} verdünnt worden.

Dieses Vorgehen war die selbstverständliche Konsequenz des Umstandes, daß *Doerr* und *Grüninger* über die **Vermehrung** des bakteriophagen Prinzips und ihre Relation zum Bakterienwachstum Aufschluß zu erhalten wünschten; versuchstechnisch schien es daher zwecks *Erzielung großer Ausschläge* rationell, von *sehr stark diluierten Lysinlösungen* auszugehen und ihre Umwandlung in hochkonzentrierte zu verfolgen. Infolgedessen gelten aber auch die Resultate, über welche *Doerr* und *Grüninger* berichten und die sich in den beiden Kurven der Abb. 1 widerspiegeln, zunächst nur für niedrige initiale Lysinlösungen und bedürfen einer *Ergänzung, welche den Reaktionsablauf für maximale, hohe und mittlere initiale Lysintiter* festsetzt; die genannten Autoren haben selbst darauf hingewiesen und die Bedeutung der offen gelassenen Lücke richtig eingeschätzt.

Dem Gesagten zufolge lag somit die Aufgabe vor, den Reaktionsablauf mit quantitativer Methodik für jene Fälle zu studieren, welche durch die Röhrchen 1—6 der Tab. I dargestellt werden. Aus ökonomischen Gründen beschränkte ich mich auf eine Auswahl und untersuchte nur vier besonders interessante Varianten, nämlich:

1. die Bakterieneinsaat in maximal konzentrierte Bakteriophagenbouillon,
2. die Einsaat in eine Verdünnung von 1 : 100,
3. die Einsaat in eine Verdünnung von 1 : 10 000 und
4. die Einsaat in eine maximal verdünnte Bakteriophagenbouillon,

d. h. also jene Fälle, welche den Röhrchen 1, 3, 5 und 10 der Tab. I gleichwertig waren. Tatsächlich wurde hiermit, wie noch gezeigt werden soll, das Auslaugen gefunden, indem sich alle nicht geprüften Zwischenwerte zwanglos in die Reihe der untersuchten Fälle interpolieren lassen.

Der erste Versuch bezog sich — wie betont — auf das *Verhalten der in maximal konzentrierte Bakteriophagenbouillon eingesäten Bakterien.*

Versuch.

In einen Kolben mit 200 ccm Bouillon ($p_H = 7{,}3$), der im Wasserbad steht (37°), wird eine Spur konzentriertes Lysin ($e_L = 8$) und 1 Öse 16stündiger Colibouillonkultur eingetragen. Nach 12 Stunden ist die Bouillon klar und der Kolben wird nun *1 Std. auf 57° (behufs Abtötung überlebender Bakterien) erhitzt*; sein Inhalt erweist sich als steril und *ergibt bei einer als Vorversuch angestellten Titration den Lysinexponenten 8.*

Nun wird dem Kolben eine bestimmte Menge einer 16stündigen Colibouillonkultur zugesetzt (ca. 3 Ösen), nachdem vorher der Inhalt durch Einstellen ins Wasserbad auf 37° vorgewärmt worden war. Die Probeentnahmen erfolgen nach 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 360 Minuten und nach 20 Stunden; das Material wird verwendet zum Gießen von Gelatineplatten (mit je 0,1 ccm) und zur Bestimmung des Lysintiters nach *Appelmans* und *Werthemann*. Die Ergebnisse zeigt die nachstehende Tabelle.

Tabelle II.

Abgelaufene Zeit	Lysinexponent	Keimzahl pro ccm
0 Minuten	8	250 000
30 „	7	110 000
60 „	—	90 000
90 „	8	34 000
120 „	—	4 000
150 „	—	2 700
180 „	8	2 500
210 „	—	10 000
240 „	7	25 000
300 „	—	110 000
360 „	8	2 000 000
20 Stunden	7	∞

Eine graphische Darstellung mit Beibehaltung der dimensionalen Verhältnisse der Abb. 1 ergab das aus Abb. 2 zu entnehmende Bild.

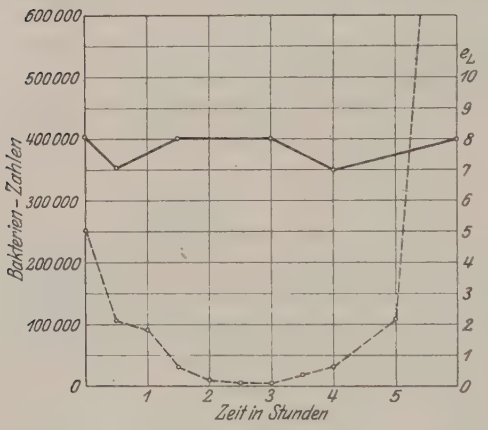

Abb. 2.

Abb. 2. Verhalten des *Lysintiters* und der *Keimzahlen* bei Einsaat der empfindlichen Bakterien in eine Bouillon von *maximaler Lysinkonzentration* ($e_L = 8$). Die ausgezogene Linie verbindet die zu verschiedenen Zeiten ermittelten Werte für die Lysinexponenten, die gestrichelte die Zahlen der in der Volumeinheit des Reaktionsmilieus- (im Kubikzentimeter) vorhandenen lebenden Keime. Die auf der Abszissenachse aufgetragenen Maßeinheiten entsprechen Stunden.

In einem zweiten, ganz analogen Versuch wurde eine *wesentlich geringere Menge lebender Colibakterien* in die konzentrierte Lysinbouillon eingesät, ohne daß sich an dem Gang der Ereignisse eine prinzipiell bedeutsame Änderung konstatieren ließ. Die Zusammenstellung der beobachteten Werte ergab die Tab. III.

Tabelle III.

Abgelaufene Zeit	Lysinexponent	Keimzahl pro ccm
0 Minuten	8	3 000
30 „	7	400
60 „	8	30
90 „	8	20
120 „	—	250
300 „	8	80 000
480 „	8	2 500 000

Schließlich variierten wir die Anordnung eines dritten, sonst gleichartigen Experimentes noch in der Richtung, daß wir die Bakterien in eine konzentrierte Lysinbouillon brachten, welche von Haus aus sicher steril war (geprüft durch Aussaat auf Nährgelatine); dadurch entfiel die Notwendigkeit des vorausgehenden Erhitzens auf 57°, welches möglicherweise einen Einfluß auf den Ablauf der später eingeleiteten Bakteriophagenreaktion besitzen konnte. Die Lysinbouillon hatte den Exponenten 9, enthielt somit das Lysin tatsächlich in der höchsten, beim Stamm „Coli sensibel" festgestellten Konzentration. In diesem Versuche wurden ferner die Keimzahlen nicht durch Aussaat von 0,1 ccm der entnommenen Proben bestimmt, sondern Gelatinezählplatten mit nur 0,001 ccm, also mit dem hundertsten Teile des sonst benutzten Bouillonquantums, angefertigt. Es hatte sich nämlich bei genauerer Analyse der antibakteriophagen Wirkung von Gelatine und anderen Kolloiden gezeigt, daß die Koloniezahlen (auf den Kubikzentimeter Bouillon berechnet) wachsen, je kleiner die mit der Gelatine vermengten Bouillonvolumina sind, und zwar in um so stärkerem Maße, je mehr Lysin die auf ihren Keimgehalt geprüfte Bouillon enthält. Offenbar verhindert ein allzu hoher Lysingehalt der Gelatineplatten die Vermehrung von Keimen, die schon leicht geschädigt, aber in lysinarmer Gelatine noch immer gut entwicklungsfähig sind. Diesem Umstande wurde eben Rechnung getragen, indem die ausgesäten Bouillonquanten nicht mehr als 0,001 ccm betrugen. Hervorgehoben sei endlich, daß der Titration des Lysins bei jeder Bouillonprobe eine 45 Minuten lange Erhitzung auf 57° vorausgeschickt wurde, so daß eine Fälschung der Titrationsresultate durch die Intervention lysinogener Keime nicht zu befürchten war. Trotz aller aufgezählten Kautelen nahm aber die Bakteriophagenreaktion den gleichen Verlauf wie in den zwei voranstehenden Versuchsreihen. Tab. IV gibt darüber Aufschluß.

Tabelle IV.

Abgelaufene Zeit	Lysinexponent	Keimzahl pro ccm
0 Minuten	9	282 000
10 „	9	190 000
30 „	8	130 000
60 „	8	60 000
90 „	8	28 000
120 „	8	6 000
150 „	9	4 000
180 „	9	1 000
210 „	9	1 000
240 „	8	1 000
300 „	8	1 000
360 „	9	5 000
510 „	8	110 000

Vergleicht man Abb. 1 mit Abb. 2, so fällt sofort der *gänzlich geänderte Reaktionstypus* in die Augen. In Worten ausgedrückt zeigt der Reaktionsablauf für den Fall der Bakterieneinsaat in maximal konzentrierte Lysinbouillon folgende Eigenschaften:

1. *Der Lysintiter hält sich während der ganzen Reaktionszeit auf gleicher Höhe unabhängig von den Absterbe- und Vermehrungsprozessen der Mikroben.* Die Absenkungen, welche das Lysinniveau scheinbar von Zeit zu Zeit erfährt, sind relativ unbedeutend, inkonstant und unregelmäßig (ohne erkennbares Zeitgesetz) über das Beobachtungsintervall verteilt und daher aller Wahrscheinlichkeit nach nur durch die Unvollkommenheiten in der Bestimmungsmethode des Lysintiters verursacht.

2. *Die Zahl der lebenden Bakterien im Kubikzentimeter nimmt vom Augenblicke der Einsaat an ab bis zum Ende der 2. bis 3. Stunde.* Das Tempo dieser Abnahme ist zunächst ein sehr rasches, verlangsamt sich aber allmählich, so daß eine Parabel als graphischer Ausdruck des Vorganges resultiert, welche schließlich mit ihrem horizontalen Ast der Abszissenachse stark angenähert ist und mit derselben annähernd parallel verläuft. An die erste Periode der *Bakterienabnahme* schließt sich in diesem Falle eine zweite Phase des *konstanten niedrigen Bakterienniveaus.* Die Kurve kann aber auch die Abszissenachse schneiden und endigt dann selbstverständlich in diesem Schnittpunkte, wenn die Bakterienabnahme bis zur kompletten Sterilisation der Lysinbouillon fortschreitet. Wie oft dieses Ereignis bei Bakterieneinsaat in maximal konzentrierte Lysinbouillon eintritt und von welchen Umständen es abhängt, ob die Bakterienabnahme zum Untergang aller Mikroben führt oder nicht, vermögen wir auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen nicht sicher zu entscheiden.

3. Bleibt die komplette Entkeimung des Reaktionsvolums aus, so beginnen sich die der Vernichtung entschlüpften Keime wieder lebhaft zu vermehren. *Die Keimzahlen steigen an, zunächst langsam, dann mit rapide wachsender Geschwindigkeit, obwohl der Lysintiter des Reaktionsmilieus seine Höhe einige Zeit beibehält.*

Betrachten wir nun vorerst den diametral entgegengesetzten Fall der Einsaat von Bakterien in *eine maximal verdünnte Lysinbouillon.* Dieser Fall ist dann gegeben, wenn die Bouillon im Versuchskolben den Exponenten + 1 hat d. h. wenn eine bis zur kompletten Lyse fortschreitende Bakteriophagenreaktion in dieser Bouillon nur stattfinden kann, falls sie nicht weiter verdünnt, sondern direkt mit Bakterien beimpft wird; die Einstellung auf diese Grenzkonzentration ist nicht gerade leicht, aber gelingt doch immerhin auf Grund der angestellten Berechnungen mit Hilfe eines ausgewerteten Lysins so regelmäßig, daß darin ein Beweis für die Zuverlässigkeit der Titriermethode von

Appelmans und *Werthemann* erblickt werden darf. Der nachstehende Versuch wurde mit einem Shigastamm und einem Shigalysin angesetzt. Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgte durch Gelatinezählplatten; die mit der Gelatine jeweils vermengten Bouillonvolumina beliefen sich auf 0,01, in der zweiten Hälfte des Versuches auf 0,001 ccm; vor den Lysintitrationen wurden die entnommenen Proben durch 1stündiges Erhitzen auf 57° (im Wasserbade) entkeimt. Außer dem „Versuchskolben" war ein „Kontrollkolben" aufgestellt, welcher bloß Bouillon (ohne Lysin) enthielt und zur gleichen Zeit wie der Versuchskolben mit derselben Menge einer 16stündigen Shigabouillonkultur beimpft wurde. Die Tab. V läßt die Bakterienvermehrung in beiden Kolben und die Lysinzunahme im Versuchskolben erkennen.

Tabelle V.

Kontrollkolben: Bakterien in ccm	Zeit	*Versuchskolben:* Bakterienzahl in ccm	Lysinexponent
340	0 Minuten	400	+ 1
	120 „	—	+ 1
60 000	180 „	90 000	— 2
900 000	240 „	1 300 000	— 2
2 000 000	300 „	2 400 000	— 4
3 800 000	330 „	4 000 000	— 6
10 000 000	360 „	400 000	— 8
—	390 „	10 000	— 9
—	420 „	0	—10
64 000000	450 „	0	— 9
—	570 „		

Im allgemeinen stößt man also hier auf Verhältnisse, wie sie *Doerr* und *Grüninger* für niedrige initiale Lysinkonzentrationen beschrieben haben: die *Inkubation der Lysinzunahme*, die lange Zeit hindurch ungestörte *Bakterienvermehrung* (man vergleiche die Keimzahlen des Kontrollkolbens, welcher kein Lysin enthielt!), das *Einsetzen und rapide Fortschreiten der Bakterienauflösung nach dem Überschreiten eines bestimmten, etwa dem Lysinexponenten — 6 entsprechenden, Lysinspiegels* in der Kulturflüssigkeit, kurz alle von den genannten Autoren als wesentlich hervorgehobenen Momente sind scharf ausgeprägt. Nur lassen sich graduelle Unterschiede konstatieren, die, wie noch gezeigt werden wird, keineswegs als zufällig betrachtet werden können. Die Bakterienvermehrung hält nämlich, wenn man von der niedrigsten, noch wirksamen Lysinkonzentration ausgeht, viel länger ($5^1/_2$ Stunden) an, und die Bakterienzahlen pro Kubikzentimeter erreichen infolgedessen das Zehntausendfache der eingesäten Mengen und hohe absolute Werte (ca. 4 Millionen); bei der initialen Lysinkonzentration $e_L = -1$ (die dem 100fachen der Konzentration $e_L = +1$ entsprach) vermehrte

sich die Einsaatmenge nur um das 40fache, die maximale Bakterienzahl im Kubikzentimeter war schon in 3 Stunden erreicht und belief sich nur auf 600 000.

Es ist klar, daß zwischen den beiden eben analysierten Extremen des Reaktionsablaufes bei maximaler und minimaler Lysinkonzentration Übergänge existieren müssen. Dieselben werden zum Vorschein kommen, wenn man für die initiale Lysinkonzentration intermediäre Werte wählt. Denn von jeder beliebigen Anfangsverdünnung aus wird ja der terminale Wert $e_L = 8$ resp. 9 erreicht; es muß also notwendigerweise ein verschiedener Grad von Neuproduktion des Lysins nachweisbar sein, welcher so beschaffen ist, daß er gerade das jeweilige Manko auf die terminale Maximalkonzentration ergänzt. Um ein Bild von dem Reaktionsgeschehen in solchen Fällen zu erhalten, untersuchten wir, wie einleitend erwähnt, die initialen Konzentrationen $e_L = -4$ und $e_L = -6$.

Versuch.

200 ccm sterile Bouillon erhielten einen Zusatz von 0,02 ccm konzentrierten Lysins ($e_L = -8$). Die Verdünnung auf das 10 000fache mußte in der Bouillon einen Lysinexponenten von — 4 ergeben; die Titration lieferte tatsächlich diesen Wert. Der die Bouillon enthaltende Erlenmeyerkolben wurde in ein Wasserbad von 37° eingestellt und nach vollzogenem Temperaturausgleich mit 1 Öse einer 14stündigen Colibouillonkultur beimpft. Die entnommenen Proben wurden auf ihren Keimgehalt und auf ihre Lysinkonzentration geprüft.

Tabelle VI.

Abgelaufene Zeit	Lysinexponent	Keimzahl
0 Minuten	4	5 500
30 „	3	6 800
60 „	3	7 500
120 „	3	75 000
150 „	4	110 000
180 „	6	420 000
210 „	—	10 000
240 „	7	1 500
420 „	7	7 500
480 „	7	35 000
15 Stunden	—	1 200 000

Versuch.

200 ccm sterile Bouillon wurden mit 2,0 ccm konzentrierten Lysins ($e_L = -8$) versetzt; der Lysinexponent dieser 100fachen Verdünnung betrug — 6 (berechnet und gemessen). Keimzählung mit Aussaatmengen von 0,001 ccm; Titerbestimmungen an den vorher durch einstündiges Erwärmen auf 57° entkeimten Proben. Sonst war die Versuchsanordnung dieselbe wie in den früheren Experimenten.

Tabelle VII.

Zeit	Lysinexponent	Keimzahl
0 Minuten	6	560 000
10 „	7	510 000
30 „	6	660 000
60 „	—	680 000
90 „	8	65 000
120 „	9	3 000
150 „	8	2 000
180 „	8	1 000
210 „	8	—
240 „	8	—
300 „	8	1 000
480 „	8	38 000
660 „	8	500 000
26 Stunden	8	∞

Die Vorgänge nach der Einsaat von Bakterien in eine mittlere Lysinkonzentration ($e_L = -4$), wie sie sich in der Tab. VI widerspiegeln, bieten nichts Bemerkenswertes; sie weichen nicht vom Reaktionstypus ab, den *Doerr* und *Grüninger* für niedere Ausgangskonzentrationen beschrieben haben und der in Abb. 1 dargestellt ist.

Interessanter ist das Verhalten der beiden Reaktionskomponenten, wenn man die Bakterien in eine sehr hohe, aber nicht maximale Lysinkonzentration einträgt. Die Bakterien vermehren sich auch in diesem Falle, aber nur in bescheidenem Ausmaße; dann setzt die Lysinzunahme bis zum Maximum und ungefähr gleichzeitig der Bakterienzerfall ein; wie man aus Tab. VII entnehmen kann, schützt eine sehr hohe initiale Lysinkonzentration durchaus nicht vor *der Entstehung* einer „Sekundärkultur".

Faßt man diese Resultate der Erhebungen über die Beeinflussung des Ablaufes der Bakteriophagenreaktion durch die initiale Lysinkonzentration zusammen, so wird es evident, daß sich de facto in jeder Konzentration andere Vorgänge abspielen, die sich aber in eine von zwei extremen Typen begrenzte Reihe einordnen lassen, deren Glieder durch fließende Übergänge miteinander verbunden sind.

Je niedriger die initiale Lysinkonzentration ist, desto stärker und desto längere Zeit müssen sich die Bakterien unter gleichzeitiger Zunahme des Lysins vermehren, bis der Zerfall, die Bakteriolyse beginnen kann. Das wird durch die Zusammenstellung einiger Werte, welche in den Versuchen ermittelt wurden, besonders deutlich:

Tabelle VIII.

Initialer Lysinexponent	Notwendige Zeit bis zum Eintritt der Bakteriophagie
+ 1	330—360 Minuten
0	240—270 „
— 4	180—210 „
— 6	60— 90 „
— 8 (maximal)	0 „

Sät man die Bakterien in eine *maximale* Lysinkonzentration ein, *dann beginnt sofort der Zerfall*; *die Bakterienvermehrung bleibt ganz aus, mit ihr aber auch eine weitere Zunahme der Lysinkonzentration.* Damit ist zunächst eine Erklärung[1]) gegeben, warum der Lysintiter einer Bouillon unter bestimmten Verhältnissen und bei Verwendung desselben Bakterienstammes und des gleichen Lysins nie über einen bestimmten Wert hinauswachsen kann; sobald eben dieser Wert erreicht wird, zerfallen die Bakterien, und neuer Zusatz lebender Bakterien hat nur erneuten Zerfall zur Folge. Gleichzeitig aber bringen diese Beobachtungen erneutes Beweismaterial für die von *Bordet*, *Doerr*, *Bail* vertretene Hypothese, daß eine Lysinzunahme ohne Bakterienvermehrung nicht eintritt, und für die Behauptung von *Doerr* und *Grüninger*, daß sich das Lysin nicht aus dem einfachen Bakterienzerfall herleitet. Die Richtigkeit dieser letzteren Auffassung tritt eben dann klarer hervor, wenn man den Zerfall allein betrachten kann; die Feststellung der Vermehrung durch Keimzählungen gibt weniger deutliche Anhaltspunkte, da die jeweilige Zahl entwicklungsfähiger Mikroben ein Produkt aus Wachstums- und Absterbeprozessen darstellt.

Der Grenzfall der Einsaat in eine maximale Lysinkonzentration widerlegt aber auch *d'Hérelles* Lehre, nach der wir in den Bakteriophagen endocelluläre Bakterienparasiten zu erblicken haben. Mit dieser Lehre ist das Ausbleiben der Lysinzunahme in diesem Grenzfall unvereinbar. Ebensowenig läßt sich von *d'Hérelles* Standpunkt die Erscheinung verständlich machen, daß die Bakterien im konzentrierten Lysin sofort zu zerfallen beginnen, in den Verdünnungen, auch wenn sie nicht sehr beträchtlich sind, dagegen nicht, sondern erst, nachdem durch Bakterienwachstum und Lysinproduktion die notwendige Bedingung der für die Lyse erforderlichen hohen Lysinkonzentration erfüllt ist. Die Lyse hängt sichtlich nicht vom Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines belebten, für die Bakterien infektiösen Mikroben ab, sondern ist die direkte Folge der Erreichung einer bestimmten Konzentration eines noch unbekannten Stoffes in dem die Mikroben umspülenden Kulturmedium.

Darf man aus der Tatsache, daß sich die Zahl der in konzentrierte

[1]) Ob diese Erklärung tatsächlich für alle Fälle ausreicht, soll hier nicht diskutiert werden. Beobachtungen von *Doerr* und *Berger* sowie *Doerr* und *Zdańsky* deuten darauf hin, daß die terminale Lysinkonzentration auch dann erreicht und nicht überschritten wird, *wenn die Bakterien am Leben bleiben. Für die Lysinproduktion scheinen ganz analoge Verhältnisse wie für die* ***Reaktionsänderungen*** *zu bestehen, welche Bakterien in flüssigen Nährböden hervorrufen;* auch hier wird eine terminale, für jede Bakterienspezies typische, von der Ausgangskonzentration der H-Ionen im Kulturmedium unabhängige H-Ionenkonzentration erreicht und schließlich beibehalten, obwohl der Stoffwechsel der Mikroben fortbesteht.

Lysinbouillon eingetragenen lebenden und empfindlichen Bakterien vom ersten Momente an beständig und unter Umständen bis zur Keimfreiheit des Reaktionsvolumens vermindert, schließen, daß die Mikroben wie durch ein Desinfiziens abgetötet und aufgelöst werden? Man fühlt sich versucht, diese Frage zu bejahen. Aber schon der Umstand, daß sich eine Bouillon mit niedrigem Lysintiter ebenso verhält wie eine normale d. h. wie eine lysinfreie, ist geeignet, Bedenken zu erwecken. Wenn maximale Lysinkonzentrationen auf die Bakterien direkt abtötend wirken, so würde man von niedrigeren Konzentrationen einen schwächeren mikrobiziden Effekt oder eine Entwicklungshemmung erwarten; das ist aber nicht der Fall.

Ferner ist noch folgendes zu bedenken. In den Versuchsanordnungen, deren sich *Doerr* und *Grüninger* sowie ich selbst bedienten, betrug die Temperatur der Nährbouillon 37°; bei diesem Wärmegrad ist aber der Stoffwechsel der Bakterien sehr lebhaft, die Lebensdauer der Zellindividuen kurz. Eine Abnahme der lebenden Bakterien wird somit auch dann festzustellen sein, wenn die konzentrierte Lysinbouillon zwar nicht im geringsten mikrobizid wirkt, wenn sie aber die Teilung der Bakterien verhindert; die Bakterienzellen werden dann altern und sterben, ohne Nachkommen zu hinterlassen, sie werden allmählich *aussterben*. Es soll keineswegs behauptet werden, daß sich die Dinge de facto so verhalten; dazu fehlt die experimentelle Basis, die vielleicht durch Variieren der Temperatur gewonnen werden könnte. Aber das ist vorderhand klar, daß die Reduktion der Keimzahlen in konzentriertem Lysin vieldeutig ist und durchaus nicht die Aussage erlaubt, daß das Lysin die Bakterien direkt angreift und vernichtet wie etwa Sublimat oder Carbolsäure. Die rasche Entstehung vollkommen resistenter und in maximalen Konzentrationen des keimschädigenden Agens ungehemmt vermehrungsfähiger Bakterienrassen würde allerdings nicht unbedingt gegen diese Auffassung sprechen, da ähnliche Beobachtungen auch bei der Gewöhnung von Bakterien und Protozoen an Sublimat, Optochin usw. gemacht wurden (vgl. hierzu *Schnabel*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, Heft 3. 1922); aber die Herkunft des Lysins aus den Bakterien, die wohl heute von den meisten Autoren als gesichert betrachtet wird, macht es unwahrscheinlich, daß es sich um ein Protoplasmagift im üblichen Wortsinne handelt, und läßt eher vermuten, daß ein vielleicht auf chemisch-physikalischem Wege (durch Verflüssigung oder Spaltung der Membranlipoide) wirksames Produkt des krankhaft veränderten Bakterienstoffwechsels vorliegt.

Was in dieser Mitteilung auf Grund von Messungen festgestellt wurde, läßt sich bei der Betrachtung mit freiem Auge andeutungsweise erkennen. Beimpft man die in Tab. I wiedergegebene Dilutions-

reihe mit gleichen Mengen junger, lebender und empfindlicher Colibakterien und bebrütet dann die ganze Serie der Eprouvetten bei 37°, so zeigen nicht alle Röhrchen das gleiche Verhalten. Die ersten drei bis vier bleiben klar, etwa vom fünften entstehen durch Bakterienwachstum Trübungen, welche sich um so später aufhellen und daher auch vor der Aufhellung um so intensiver werden, je niedriger die Ausgangskonzentration des Lysins war. Beobachtungen dieser Art hat bereits *d'Hérelle* ausführlich beschrieben und in der späteren Literatur kehren sie mehrfach wieder. Daß das verschiedene Verhalten des Trübungsgrades durch die differente Intensität der Bakterienvegetation verursacht werde, nahmen alle Beobachtungen an und in gewissem Sinne erscheint diese Annahme durch die hier veröffentlichten zahlenmäßigen Angaben bestätigt. Nur in einem Punkte weichen wir ab, insofern als wir in der jeweils vorhandenen Trübungsstärke keinen Maßstab für die Zahl der in diesem Zeitpunkte gerade *lebenden* resp. *entwicklungsfähigen* Mikroben erblicken können. Das wäre offenbar dann der Fall, *wenn die eigentliche Auflösung, welche das Transparentwerden der Bouillon bedingt, die Bakterien in einem Stadium befallen würde, in welchem sie noch leben und vermehrungsfähig sind.* Offenbar ist aber die Lyse *sekundär* und betrifft nur Bakterien, welche bereits abgestorben oder doch wenigstens ihrer Entwicklungsfähigkeit beraubt sind, ein Sachverhalt, den auch *W. C. Davison* als den richtigen hinstellt. Wir sind zu dieser Auffassung nicht nur auf Grund der Erwägungen von *Doerr* gelangt, sondern auch dadurch, daß sich Differenzen ergaben, wenn wir den Keimgehalt von Bouillonen, in welchen eine Bakteriophagenreaktion ablief, fortlaufend durch das Gelatineplattenverfahren einerseits und durch makroskopische oder nephelometrische Schätzung der Suspensionsdichte andererseits zu bestimmen versuchten. Ein solches Beispiel möge an dieser Stelle Platz finden.

Versuch.

200-ccm-Bouillonkolben mit geringem Lysingehalt ($e_L - 1$). Wasserbad von 37°. — Einsaat einer Öse 16stündiger Bouillonkultur von „Coli sensibel". Probeentnahmen a) zwecks Zählung der entwicklungsfähigen Keime im Gelatineplattenverfahren, b) zwecks Ermittlung des Lysintiters, c) zwecks makroskopischer Beurteilung des Trübungsgrades. Die Ergebnisse enthält

Tabelle IX.

Abgelaufene Zeit	Lysinexponent	Keimzahl	Trübungsgrad
0 Minuten	1	660	klar
120 „	1	—	„
150 „	1	46 000	„
180 „	3	96 000	„
210 „	4	270 000	„
240 „	6	675 000	„
270 „	7	400	*deutl. Trübung*
300 „	8	10	klar
360 „	8	0	„

Nach 240 Minuten enthielt also die Bouillon 675 000 entwicklungsfähige Keime im Kubikzentimeter und war makroskopisch klar, nach 270 Minuten waren nur mehr 400 Keime nachweisbar, aber das Nährmedium war stark getrübt und nach 270 Minuten war wieder Klärung eingetreten, obwohl die weitere Abnahme der *lebenden* Keime viel zu gering war, um für die Aufhellung irgendwie in Betracht zu kommen. Da es wohl als unwahrscheinlich bezeichnet werden kann, daß die nach 270 Minuten beobachtete Trübung gar nicht auf die Bakterien zurückzuführen ist, und da weiter zunächst keine Veranlassung vorliegt, für dieselbe nicht die Zahl, sondern einen besonderen Zustand der Bakterien verantwortlich zu machen, bleibt nur der Ausweg übrig, daß sich die Bakterien im Zeitraum von 30 Minuten sehr lebhaft vermehrt haben und daß die neugebildeten Exemplare bald nach ihrer Entstehung abgestorben sind, ohne aber sofort der die Wiederkehr der Transparenz bedingenden Lösung zu verfallen, die erst in der nächsten halben Stunde bis zum makroskopisch wahrnehmbaren Effekt fortschritt.

In diesen Beobachtungen der Inkongruenz zwischen der Zahl der lebenden Bakterien und der nephelometrisch bestimmbaren Gesamtzahl der noch ungelösten Bakterienzellen (Beobachtungen, die in einer sehr großen Anzahl von Versuchen und unter allen Kautelen angestellt wurden) stecken die Ansätze zu neuen Möglichkeiten, in das Reaktionsgeschehen und damit in das Wesen der übertragbaren Lyse weitere Einblicke zu gewinnen.

Zusammenfassung.

1. Bei der Analyse der Reaktion zwischen bestimmten Bakteriophagenstämmen (Coli- und Shigabakteriophagen) und den für dieselben empfindlichen Bakterienrassen konnte festgestellt werden, daß, von geringfügigen Abweichungen abgesehen, stets dieselbe Endkonzentration des Lysins erreicht wurde.

2. Dieser terminale Lysintiter war von der Ausgangskonzentration des Lysins und bis zu einem gewissen Grade von der Menge der in das Reaktionsmilieu eingesäten Bakterien unabhängig.

3. Der Reaktionsablauf wird hingegen von der initialen Lysinkonzentration bestimmt.

4. In konzentrierter Lysinbouillon nimmt die Zahl der lebenden Bakterien vom Augenblicke der Einsaat an beständig ab; der Lysintiter bleibt aber unverändert. Der Bakterienzerfall kann also nicht die Quelle der Lysinzunahme sein.

5. In verdünnter Lysinbouillon vermehren sich die Bakterien nach einer von der Norm nicht abweichenden Inkubationsperiode und das Lysin nimmt (von den proliferierenden Bakterien abgeschieden) zu,

bis es genügend konzentriert wird, um den sub 4. beschriebenen Effekt der Lyse herbeizuführen.

6. Je stärker die Lysinbouillon verdünnt ist, desto ausgiebiger und anhaltender ist die Bakterienvermehrung und desto mehr Zeit verstreicht, bis die Bakterienauflösung einsetzt. Sie verläuft dann mit derselben Geschwindigkeit, wie in einer von Haus aus maximal konzentrierten Lysinbouillon, hat also wohl in beiden Fällen denselben Mechanismus.

7. Der Grad der Trübung einer Bouillon, in welcher sich eine Bakteriophagenreaktion vollzieht, entspricht nicht der Zahl der *lebenden* Bakterien. Aus der Art der Inkongruenz und gewissen Besonderheiten ihres zeitlichen Verhaltens scheint hervorzugehen, daß die Auflösung nicht primär die lebenden Zellen ergreift, sondern daß letztere zunächst absterben und erst sekundär unter Aufhellung der betreffenden Suspension zerfallen.

8. Diese Ergebnisse machen eine belebte Natur des bakteriophagen Agens unwahrscheinlich.

9. Das Lysin scheint, obwohl es bei entsprechender (maximaler) Konzentration direkt den Untergang der Bakterien verursacht, kein Protoplasmagift im Sinne der chemischen Desinfektionsmittel zu sein, sondern ein (vermutlich membranschädigender) Stoff, welchen der Stoffwechsel der Bakterien unter bestimmten Bedingungen in großen Mengen liefert.

Literaturverzeichnis.

Es sei hier verwiesen auf die Literaturangaben in der Arbeit von *H. Schlossberger*, Zentralbl. f. Haut- u. Geschlechtskrankh. Bd. IV, H. 7, S. 401. 1922. — Die nachstehend angeführten Arbeiten sind in dem Verzeichnis von *Schlossberger* nicht enthalten: *Appelmans*, Quelques applications de la méthode de dosage du bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 9. 1922. — *Appelmans* und *J. Wagemans*, Bactériophages de diverses provenances. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 13. 1922. — *Arkwright*, Variation in bacteria in relation to agglutination by salts and specific sera. Proc. of the pathol. soc. Great Britain and Ireland **23**, 358. 1920. — *Bachmann, A.* und *L. Aquino*, Sur le bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 18. 1922. — *Bail, O.*, Elementarbakteriophagen des Shigabacillus. Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 35, S. 722, Nr. 36/37, S. 743, Nr. 38/39, S. 765. — *Bail, O.* und *T. Watanabe*, Versuche über spezifische Bakteriophagenwirkung. Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 16, S. 362. — *Becherich, A.* und *P. Hauduroy*, Au sujet du titrage du bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 165. 1922. — *Becherich, A.* und *P. Hauduroy*, Le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoide. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 168. 1922. — *Becherich, A.* und *P. Hauduroy*, Au sujet de l'obtention du bactériophage par antagonisme microbien. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 15, S. 881. 1922. — *Bergstrand, H.*, On the supposed life-cycle of bacteria. Bull. of the John Hopkins hosp. **32**, Nr. 365, S. 234. 1921. — *Bergstrand, H.*, Sur la lyse microbienne transmissible. Cpt. rend.

des séances de la soc. de biol. **86**, H. 9. 1922. — *Bergstrand, H.*, Sur la variation des bactéries. Cpt. rend, des séances de la soc. de biol. **86**, H. 9, S. 492. 1922. — *Bordet* und *Ciuca*, Sur la théorie du virus dans la lyse microbienne transmissible et les conditions de régénération du principe actif. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 5. 1922. — *Bordet* und *Ciuca*, Variations d'énergie du principe actif dans l'autolyse microbienne transmissible. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 24, S. 366. 1922. — *Botez, A.*, La-bactériolyse en série par le violet de méthyle. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **85**, Nr. 27, S. 585. 1921. — *Bruynoghe, R.* und *Appelmans*, La neutralisation des Bactériophages de provenance différente. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 21, S. 96. 1922. — *Bruynoghe, R.* und *J. Maisin*, Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du staphylocoque. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **85**, Nr. 36. 1921. — *Bruynoghe, R.* und *J. Maisin*, La phagocytose du Bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, S. 292. 1922. — *Bruynoghe, R.* und *J. Maisin*, Au sujet de la réaction consécutive à l'injection du Bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 294. 1922. — *Bruynoghe, R.* und *J. Maisin*, Réponse à la note de M. M. Gratia et Jaumin relative aux réactions produites par l'injection de bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 13. 1922. — *Callow, B. R.*, Bacteriophage phenomena with Staphylococcus aureus. Journ. of infect. dis. **30**, Nr. 6. 1922. — *Combiesco*, Sur le phénomène de d'Hérelle. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 20, S. 17. 1922. — *Damade, R.*, Etude d'une épidémie de dysenterie bacillaire. Thèse Facult. Médecine de Bordeaux. 1919. — *Davison*, The application of bacteriolysants to the treatment of bacillary dysentery in children. Americ. journ. of dis. of childr. Chicago (in press). — *Davison*, Observations on the nature of bacteriolysants. Americ. journ. of dis. of childr. Chicago (in press). — *Doerr, R.*, Die Bakteriophagen (Phänomen von Twort und d'Hérelle). Klin. Wochenschr. 1922, H. 30 u. 31, S. 1489 u. 1537. — *Doerr, R.* und *W. Grüninger*, Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen von Bakterien und Bakteriophagen (übertragbarem Lysin) zur Galle. Schweiz. med. Wochenschr. 1922, Nr. 31, S. 761. — *Fabry*, Autolyse microbienne transmissible obtenue par antagonisme microbien. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 24, S. 369. 1922. — *Fletcher*, Capsulate mucoid forms of paratyphoid and dysentery bacilli. Journ. of the roy. army med. corps **34**, 219. 1920. — *Francon, F.* und *R. Marquézy, R.* Le phénomène de d'Hérelle: les faits, les interprétations, les applications. Bull. méd. 1922, Nr. 3, S. 33. — *Ganter* und *van der Reiz*, Dtsch. Arch. f. klin. Med. **137**, 348. 1921. — *Gengou*, Contribution à l'étude des substances bactériolytiques des leucocytes. Bull. de l'acad. roy. de méd. de Belgique 1920, S. 993. — *Gengou*, Les substances bactériolytiques des leucocytes et leurs rapports avec l'aléxine. Ann. de l'inst. Pasteur **35**, 497. 1921. — *Gratia, A.*, La lyse transmissible du staphylocoque. Sa production, ses applications thérapeutiques. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 276. 1922. — *Gratia, A.*, Twort-d'Hérelle phenomenon. II. Lysis and Microbic variation. Journ. of exp. med. **35**, 287. 1922. — *Gratia, A.* und *O. Jaumain*, Au sujet des réactions consécutives aux injections de principe lytique staphylococcique. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 519. 1922. — *Gratia, A.* und *O. Jaumain*, Réaction fixation de l'alexine et spécifité antigénique des principes lytiques. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 99. 1922. — *Gratia, A.* und *O. Jaumain*, Remarques apropos de la communication de M. M. Bruynoghe et Appelmans. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 99. 1922. — *Gratia, A.* und *de Namur*, Individualité des principes lytiques staphylococciquesde provenances différentes. Cpt. rend des séances de la soc. de biol. **87**, 364. 1922. — *D'Hérelle, F.*, Sur la culture du microbe bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 52. 1920. — *D'Hérelle, F.*,

Sur les antilysines d'origine bactérienne. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 7 1922 — *D'Hérelle, F.*, Sur la présance du bactériophage dans les leucocytes. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 9. 1922. — *D'Hérelle, F.*, Sur la prétendue production d'un principe lytique sous l'influence d'un antagonisme microbien. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol **86**, H. 12 1922. — *D'H¹relle, F.*, Sur une cause d'erreur pouvant intervenir dans l'étude du bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 27. 1922. — *Jaumain* und *Meulemann*, Absorption du principe lytique par les microbes tués. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, H. 24. 1922. — *Kruif, P. H. de*, Dissociation of Microbic. species. Journ. of exp. med. I. **33**, 773. 1921; II., III., IV., **29**, 34, 37 u. 38. 1921. — *Lisbonne, M.* und *L. Carrère*, Antagonisme microbien et lyse transmissible du bacille de Shiga. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 11. 1922. — *Maymone, B.*, Biological variation of B. shigae observed during an epidemic of bac. dys. Ann. d'ig. **29**, 653. 1919. — *Metalnikow, S.*, Dysentérique et bactériophage de d'Hérelle chez les génénilles de Galleria mellonella. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **83**, 676. 1920. — *de Necker*, De l'influence de la chaleur sur le principe bactériophage. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, H. 13. 1922. — *Nicolle, M.*, Action du Bacillus subtitilis sur diverses bactéries. Ann. de l'inst. Pasteur **21**, 613. 1907. — *Oliviéro*, Diskussion zum Vortrag von Philibert. Rev. de path ol. comparée 1921, Nr. 192, S. 16. — *Orticoni*, Di kussion zum Vortrag von Philibert. Rev. de pathol. comparée 1921, Nr. 192, S. 17. — *Otto* und *Winkler*, Über die Natur des d'Hérelleschen Bakteriophagen. Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 12, S. 383. — *Pfreimbter, Sell, Pistorius*, Eine neue Methodik zum Nachweis des „d'Hérelleschen Virus". Münch. med. Wochenschrift 1922, Nr. 14, S. 495. — *Philibert, A.*, Le principe bactériophage (phénomène de d'Hérelle). Rev. de pathol. comparée 1921, Nr. 192, S. 1. — *Pico (C.-E.)*, Sur la nature du principe bactériophage de Twort-d'Hérelle. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 1106. 1922. — *Pico (C.-E.)*, Le principe lytique est-il contenu dans les bactéries? Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 687. 1922. — *Pico (C.-E.)*, Précedents historiques sur la lyse microbienne transmissible. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 685. 1922. — *Pinoy*, Dictyostelium mucoroides und Bac. fluorescens. Ann. de l'inst. Pasteur **21**, 628. 1907. — *Pinoy*, Sur les myxobactéries. Ann. de l'inst. Pasteur **35**, 486. 1921. — *Piorkowsky, G.*, Beitrag zur Streptokokkenfrage. Anwendung des d'Hérelleschen Phänomens auf Streptokokken. Med. Klinik 1922, Nr. 15, S. 474. — *Prausnitz, K.*, Über die Natur des d'Hérelleschen Phänomens. Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 33, S. 1639. — *Rhodes, B.*, The phenomenon of bacteriophage. Journ. of laborat a. clin. med. **7**, 288. 1922. — *Saldanha, A.*, Phénomène de d'Hérelle. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, Nr. 11. 1922. — *Seiffert, W.*, Das d'Hérellesche Phänomen. Med. Klinik 1922, Nr. 31, 33, 34. — *Wassermann, A. v.* und *M. Ficker*, Über die Rolle von Aktivatoren bei der Bildung von giftigen Spaltprodukten im Darminhalt. Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 23, S. 1159. — *Watanabe, T.*, Über die Natur des bakteriophagen Virus. Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 3, S. 53. — *Watanabe, T.*, Über die Wirkung von Styphylokokkenbakteriophagen. Wien. klin. Wochenschr. 1922, Nr. 27, S. 603. — *Weinberg, M.* und *P. Aznar*, Autobactériolysine et le phénomène de d'Hérelle. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **86**, 833. 1922. — *Weinberg, M.* und *P. Aznar*, Quelques faits nouveaux sur les autobactériolysines. Cpt. rend. des séances de la soc. de biol. **87**, 136. 1922. — *Werthemann, A.*, Über das Verhalten der Lysine (Bakteriophagen) in der Zirkulation von Warm- und Kaltblütern. Arch. f. Hyg. 1922. (Im Druck.) — *Zingher, A.*, The bacteriophage reaction of d'Hérelle. Proc. of the New York pathol. soc. (U. S. A.) **21**, Nr. 1/5, S. 2. 1921. — Abgeschlossen am 15. X. 1922.